

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 645 449 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 94114675.5

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/10, C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 17.09.94

(30) Priorität: 24.09.93 DE 4332463

(71) Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.03.95 Patentblatt 95/13

D-68298 Mannheim (DE)

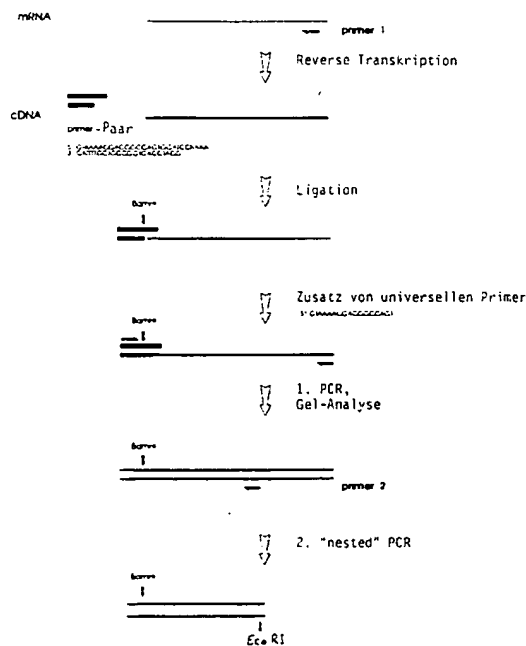
(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

(72) Erfinder: Bertling, Wolf, Dr.
Meisenweg 22
D-91056 Erlangen (DE)

(54) Verfahren zur spezifischen Klonierung von Nukleinsäuren.

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß zwei teilweise komplementäre, doppelsträngige Primer an das 3' Ende eines einzelsträngigen DNA Stranges ligiert werden. Der zweite Strang wird mittels einer DNA Polymerase synthetisiert wobei die verwendeten Primer zumindest teilweise mit dem anligierten Oligonukleotid komplementär sind. Die so erhaltene Ziel-DNA kann dann mit zwei spezifischen Oligonukleotiden gezielt amplifiziert werden.

Figure 1



EP 0 645 449 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung von Nukleinsäuren mittels Ligation einer einzelsträngigen DNA unter Verwendung zweier teilweise komplementärer, doppelsträngiger Oligonukleotide, Synthese des zweiten Stranges sowie gegebenenfalls gezielte Amplifikation der Ziel-DNA mittels zweier spezifischer Oligonukleotide und Reagenzien zu deren Durchführung.

Nukleinsäuren sind für alle bisher bekannten Organismen als Informationsträger die Grundlage spezifischer Lebensformen. Sie kodieren für Proteine oder haben auch katalytische oder strukturelle Wirksamkeiten. Eine Reihe von Techniken zum Klonieren und Vermehren von Nukleinsäuren sind für Desoxyribonukleinsäure (DNA) etabliert. Das Klonieren von Ribonukleinsäuren (RNA) hingegen ist besonders für die Klonierung von selten vorkommenden RNAs und für die Klonierung von RNAs in voller Länge noch relativ schwierig.

Bestehende Methoden für die RNA Klonierung basieren auf der Isolierung von Gesamt- oder mRNA aus Zellen, der Übersetzungen der RNA in ein cDNA: RNA-Hybrid mittels reverser Transkriptasen (AMV, MoMuLV), Abbau des RNA-Anteils mit RNase H, gefolgt von der Synthese des komplementären cDNA Stranges mit Klenow DNA Polymerase (als Standardmethoden beschrieben in Ausubel et al) (Editor) 1987 Current Protocols in Molecular Biology). Die Synthese des zweiten Strangs der DNA benötigt einen Primer. Der kann aus kurzen RNA Fragmenten bestehen, die von RNase H Verdau resultieren (Gubler 1987, Methods of Enzymology 152, 330 - 335), er kann, wie in der klassischen Methode, durch eine Rückfaltung der einzelsträngigen cDNA gegeben sein (Gubler, 1987, Methods of Enzymology 152, 325 - 329) oder auch durch Zugabe von hoch degenerierten kurzen Oligonukleotiden entstehen (Feinberg, Vogelstein, 1983 Analytical Biochemistry 132, 6 - 13). In allen Fällen geht in der Regel das 3' Ende der einzelsträngigen cDNA bei der Klonierung verloren, da mangels Primer kein komplementärer Strang synthetisiert wird. Die so erzeugte doppelsträngige DNA kann dann über die Klonierung von geeigneten Adaptoren spezifisch in Vektoren (Plasmide, Cosmide, Phagen) kloniert und anschließend effizient in Bakterien transformiert oder in Phagen verpackt werden.

Durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al, Science 1988, 239, 487 - 491) konnte eine weitere Verbesserung der Klonierung von RNAs über die aufgezeigte Methode erzielt werden. Die Kombination dieser beiden Methoden erlaubt die Klonierung von extrem geringen Ausgangsmengen an RNA (geringe Menge an Ausgangszellen) oder die Klonierung von extrem selten vorkommender RNA.

Die Verwendung von PCR in der cDNA-Klonierung setzt voraus, daß die cDNA sowohl an ihrem 3' Ende als auch an ihrem 5' Ende DNA Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz aufweist. Eine Sequenz mit bekannter Nukleotidfolge kann durch ein Oligonukleotid mit poly-dT Schwanz, der komplementär zum 3' Ende der mRNA ist, relativ einfach an das 5' Ende der cDNA eingefügt werden.

Weitaus schwieriger ist die Verankerung einer spezifischen Sequenz am 3' Ende der cDNA. Die bisher beschriebenen Methoden sind:

Synthese eines Homopolymers (z.B. dG oder dA) mit terminaler Transferase. Diese Methode ist als "Rapid Amplification of cDNA Ends" (RACE) oder "Anchored PCR" bekannt geworden (Frohman et al, 1988, PNAS 85, 8998 - 9002). Diese Methode beruht darauf, daß an das 3' Ende der cDNA ein Homopolymer ansynthetisiert wird und anschließend eine PCR durchgeführt wird, wobei ein Primer komplementär zum neu synthetisierten 3' Homopolymer-Ende der Einzelstrang cDNA ist, der zweite Primer ist homolog einem Bereich des 5' Endes der cDNA.

Zwei weitere Methoden, die ebenfalls einen Amplifikationsschritt enthalten, sind in den letzten Jahren veröffentlicht worden. Beide Methoden verwenden T4 RNA Ligase. Diese Ligase oder eine andere einzelstrangspezifische Ligase wird entweder dazu verwendet, um an das 3' Ende der cDNA einen Primer zu "verankern". Zwei weitere Primer, einer homolog zu einem weiter 5' liegenden Bereich des reversen Transkripts, der einzelsträngigen cDNA, und einer komplementär zu dem anliegenden Primer, werden dann in einer nachfolgenden Amplifikation (PCR) eingesetzt (Troutt et al, 1992, PNAS 89, 9823 - 9825) (Dymas Mallet für Rhône Poulenc Rorer SA, französisches Patent No. 9108294). Alternativ dazu können die durch reverse Transkription entstandenen einzelsträngigen DNAs jeweils über ihre 5' bzw. 3' Enden miteinander verbunden werden (head-to-tail), so daß in einer anschließenden Amplifikation zwei spezifische Primer, einer homolog und einer komplementär zu einer vorgegebenen Sequenz der zu amplifizierenden cDNA, eingesetzt werden können (Hofmann, Brian 1991, PCR Methods and Application 1, 43 - 45).

Alle beschriebenen Techniken zeigen Nachteile, die ihre Anwendung limitieren. Besonders hervorzuheben ist, daß die Stufen, die Primer verwenden, nicht immer korrekt kontrollierbar sind und die Spezifität der Primer, speziell im Fall der Homopolymere limitiert ist. Das führt nicht nur zu beträchtlichen Hintergrundsignalen, sondern bedingt zumindest bei den nicht auf Amplifikation beruhenden Techniken, aber auch bis zu einem gewissen Grad bei den PCR-abhängigen Schritten zu Produkten, die die Sequenzinformation des 5' Endes der RNA

(meist mRNA) nicht enthalten. Zumindest die nicht auf Amplifikation beruhenden Verfahren lassen auch die Erstellung von Genbanken nur sehr bedingt zu da nicht aus allen Zellen und Gewebeproben genügend RNA isolierbar ist, um diese Prozeduren durchzuführen und die erhaltenen doppelsträngigen DNA Fragmente erfolgreich zu klonieren.

Die Methode, die unter Synthese eines Homopolymers verläuft, ist sehr stark limitiert dadurch, daß die terminale Transferase nicht sehr effizient dG oder dA aber auch keine langen Homopolymerketten mittels dC oder dT synthetisiert und die Reaktion schlecht zu kontrollieren ist.

Ein weiterer Nachteil wird bei der darauffolgenden Amplifikation ersichtlich. Die verwendeten Primer (z.B. homopolymere dC oder dA Primer) neigen zur Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten, was den Hintergrund an unerwünschten klonierten Fragmenten erheblich erhöht.

Die anderen amplifikationsabhängigen Methoden verwenden Enzyme, die in der Lage sind, einzelsträngige Moleküle zu ligieren, vorzugsweise T4 RNA Ligase. Diese Ligase neigt dazu, kurze Oligonukleotide und Fragmente (von RNA und DNA) zu ligieren und die Ausbeute an konkatameren, einzelsträngigen cDNAs ist relativ gering. Entsprechend gering ist dann auch die Ausbeute an Amplifikationsprodukten.

Oligonukleotidprimer wiederum werden nicht nur an cDNA ligiert, sondern ebenso an RNA und kurze Fragmente von cDNA und RNA. Solche Ligationsprodukte erhöhen den Hintergrund an falsch amplifizierten Produkten und erfordern sehr aufwendige Reinigungsschritte, die wiederum mit Materialverlust einhergehen.

Die genannten Probleme werden durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst. Es handelt sich im einzelnen dabei um ein Verfahren zur Klonierung von Nukleinsäuren mittels Ligation einer einzelsträngigen DNA unter Verwendung zweier teilweise komplementärer, und damit doppelsträngiger Oligonukleotide, der Möglichkeit daran die Synthese des zweiten Stranges einzuschließen sowie der möglichen gezielten Amplifikation der Ziel-DNA mittels zweier spezifischer Oligonukleotide anzuhängen. Eine bevorzugte Anwendung der Erfindung ist das Herstellen von Klonen, besonders von Klonen, die das komplette 5' Ende von mRNAs repräsentieren. Die in diesem Verfahren verwendeten Produkte sichern eine hohe Spezifität der Produkte. Ob und bis zu welchem Grad Amplifikation des Produkts des Ligationsschritts gewünscht wird, kann frei bestimmt werden.

Eine Anwendung der Erfindung besteht daher in einem Klonierungsschema, das durch folgende Schritte charakterisiert ist:

- In einem ersten Schritt wird eine einzelsträngige DNA oder auch doppelsträngige DNA

mit einzelsträngigem Anteil für die weiteren Schritte bereit gestellt, hergestellt, gewonnen oder anderweitig erworben (Ziel-DNA). Bei der Erstellung aus RNA kann es sich als besonders günstig erweisen, ein Enzym zu verwenden, das bei höheren Temperaturen arbeiten kann.

- In einem zweiten Schritt werden die für den jeweiligen Versuch benötigten Primer bereit gestellt, hergestellt, gewonnen oder anderweitig erworben. Dabei ist darauf zu achten, daß der an das 3' Ende der DNA zu ligierende Primer an seinem 5' Ende phosphoryliert vorliegt.
- In einem weiteren Schritt werden ein Gemisch zweier, teilweise komplementärer Primer (Oligonukleotide oder evtl. Polynukleotide), von denen mindestens und bevorzugt einer an einem Ende über den komplementären Bereich hinausreicht (Überhang), vorbereitet. Dieser Überhang stellt einen degenerierten Bereich dar, das heißt, an bevorzugter Weise jeder möglichen Position befindet sich eins der klassischen Nukleotide oder auch ein modifiziertes Nukleotid mit Desoxy-Inosin. Daraus ergibt sich im Gemisch die bevorzugterweise gleiche Repräsentation jeder verwendeten Base an jeder Position des Überhangs. Dieses so beschriebene Gemisch vom Primern wird im folgenden Primerpaar genannt.
- In einem weiteren Schritt wird die Ligation des Primerpaares an die Ziel-DNA vorbereitet und durchgeführt. Die beiden letzten Schritte können auch gemeinsam durchgeführt werden. Es läßt sich empfehlen, vor dem Ansetzen der Ligation überschüssige Primer, z.B. durch Gelfiltration, zu entfernen.
- In einem weiteren Schritt kann die Amplifikation des Ligationsprodukts durchgeführt werden, evtl. nach vorausgegangener Reinigung, Verdünnung oder Konzentrierung des Ligationsansatzes. Die Amplifikationstemperaturen sollen dabei analog der bekannten Maßnahmen (US. 4.683.195 und 4.683.202) gewählt werden.

Aufgrund seiner Spezifität für doppelsträngige Bereiche von DNA ist ein bevorzugtes Enzym für die Ligrationsreaktion die T4 DNA Ligase. Es empfiehlt sich, die Ligation bei 15°C bis 25°C über einen Zeitraum von 1 - 16 Stunden durchzuführen. Üblicherweise werden dabei kürzere Zeiten mit höheren Temperaturen und längere Inkubationszeiten mit niedrigeren Temperaturen kombiniert. Vorzugsweise wird die Ligation bei 16°C über Nacht durchgeführt. Es stehen neuerdings auch thermostabile Ligasen zur Verfü-

gung. Bei der Auswahl der zu verwendenden Oligonukleotide empfiehlt es sich, sowohl auf eine ausreichende Länge, ein adäquates G/C-Verhältnis und auch die Verfügbarkeit von Restriktionsendonuklease Erkennungsstellen zu achten, die bei einer späteren Klonierung verwendet werden können.

In abschließenden Schritten findet die Vorbereitung des Amplifikates für eine anschließende Weiterbehandlung, z.B. zur Sequenzierung oder Klonierung statt. Es kann sich auch als angebracht erweisen, das Amplifikationsprodukt einer weiteren sogenannten "Nested" PCR zu unterwerfen, um z.B. den Hintergrund zu vermindern oder die Spezifität zu erhöhen. Bei der ersten Amplifikation wird meist, z.B. aus Kostengründen, derselbe Primer als sogenannter Downstream Primer verwendet, wie für die reverse Transkription.

Bei der zweiten, "Nested" Amplifikation wird nun ein Downstream Primer gewählt, der nach oben verschoben, d.h. näher am 3' Ende der einzelsträngigen DNA gelegen ist. Prinzipiell ist bei Verwendung geeigneter Enzyme auch die sukzessive Durchführung aller enzymatischen Reaktionen in einem Gefäß möglich.

Bevorzugt wird die Erfindung auf einzelsträngige cDNA angewandt, die durch reverse Transkription von mRNA entstanden ist. Die Herstellung von RNA, sowie die reverse Transkription dieser RNA wird nach bekannten und beschriebenen Protokollen stattfinden (z.B. Ausubel et al 1987 (Editor) Current Protocols of Molecular Biology). Es ist für sämtliche Primer, außer dem, der an das 3' Ende der DNA ligiert werden soll, nicht nötig, sondern eventuell sogar nachteilig, am 5' Ende phosphoryliert zu sein.

Durch einen zusätzlichen Schritt läßt sich auch genomische DNA als Vorlage für die Ligation an das Primerpaar verwenden. In diesem Schritt wird genomische DNA mittels eines Primers, der komplementär oder homolog zu einem bekannten Teil der DNA ist, als Vorlage für eine Extension mittels einer DNA-abhängigen DNA Polymerase bzw. einer DNA-abhängigen RNA Polymerase (falls der Primer entsprechende Promotorsequenzen, z.B. für den RNA Polymerase des Phagen SP6, enthält) in einzelsträngige DNA bzw. RNA überführen. Durch Aufreinigen der einzelsträngigen Produkte - z.B. über eine für einzelsträngige Moleküle spezifische (z.B. Hydroxylapatit) oder RNA spezifische Säule oder auch über eine Affinitätsaufreinigung, falls z.B. der verwendete Primer eine für dieses Verfahren geeignete Modifikation (z.B. Biotin, Digoxigenin) enthält - läßt sich auch daraus ein geeignetes Substrat für die anschließende Ligation erhalten.

Es ist für manche Anwendungen wünschenswert, modifizierte Nukleotide, z.B. m⁵dC (an Position 5 methyliertes Desoxycytosin) zu verwenden,

die zum Erhalt eines Produkts führen, das resistent gegen Restriktionsendonukleasen ist.

Figur 1: Gibt einen Überblick über das Prinzip der Beispiele 1 - 4. Nach reverse Transkription wurde das Primerpaar an die einzelsträngige cDNA ligiert, anschließend mit dem Primer, der für die reverse Transkription verwendet worden war, und einem, der komplementär zu einem Teil des an die cDNA ligierten Primers war, einer PCR unterworfen. Nach Aufreinigung des Amplifikationsproduktes wurde eine zweite PCR durchgeführt mit dem gleichen upstream, aber einem anderen downstream Primer, der aber homolog zu einer Sequenz, die näher am 3'Ende der ursprünglichen cDNA gelegen war. Das daraus resultierende Amplifikationsprodukt wurde danach noch für die Klonierung vorbereitet.

Beispiele:

Abbildung 1 gibt einen Überblick über das Prinzip des Beispiels 1 und 2 sowie Beispiel 3 und 4. Nach reverse Transkription wurde das Primerpaar an die einzelsträngige cDNA ligiert, anschließend mit dem Primer, der für die reverse Transkription verwendet worden war, und einem, der komplementär zu einem Teil des an die cDNA ligierten Primers war, einer PCR unterworfen. Nach Aufreinigung des Amplifikationsproduktes wurde eine zweite PCR durchgeführt mit dem gleichen Upstreamprimer, aber einem anderen, ebenfalls spezifischen, aber homolog zu einer Stelle, die näher am 3' Ende der ursprünglichen cDNA gelegen war, durchgeführt. Das daraus resultierende Amplifikationsprodukt wurde danach noch für die Klonierung vorbereitet.

Beispiel 1:

Herstellung einer spezifischen cDNA durch reverse Transkription.

RNA wurde präpariert wie beschrieben (Ausubel et al 1987). Oligonukleotide wurden an einem Gene-Assembler plus (Pharmacia) synthetisiert und nach Detritylierung gereinigt durch Zentrifugation durch eine G 50 Säule.

Ein spezifischer Primer (30 pmol), der komplementär zur mRNA war, wurde in einem 30 µl reversen Transkriptionsansatz eingesetzt. Dieser Ansatz verlief in folgenden Puffer:

10 mM Tris HCl (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 1 mM. Der Ansatz enthielt ferner 3 µg Gesamt-RNA, 40 units RNAsin und 50 units MoMuL V reverser Transkriptase und wurde auf 30 µl mit sterilem bidestillierten Wasser aufgefüllt. Die reverse Transkription wurde für 15 Min bei 42°C durchgeführt.

Danach wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt, in 350 µl RNase Verdaupuffer aufgenommen (Tris HCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM). Die verbliebene RNA wird durch Zugabe von RNase A (1,5 units) und RNase T1 (700 units) bei 37 °C 30 Min lang verdaut. Das im Ansatz enthaltene cDNA Produkt wurde durch eine Zentrifugationsäule (Sephadex G50) gereinigt. Nach verkleinern des Volumens des cDNA enthaltenden Eluats durch Lyophilisation und Ethanolpräzipitation wurde das Produkt in 6 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Beispiel 2:

Ligation eines Primerpaars an eine einzelsträngige Ziel-DNA.

Die 2 für die Ligation nötigen Primer (das Primerpaar) sind in ihrer Sequenz in Abbildung 1 wiedergegeben. Der Primer, der mit seinem 5' Ende an das 3' Ende der cDNA von Beispiel 1 ligiert werden sollte, lag phosphoryliert vor.

Die Ligation wurde in 10 µl mit 10 pmol jedes Primers bzw. Primergemisches bei 16 °C über Nacht ausgeführt in einer Lösung, die Tris HCl (pH 7,5) 66 mM, MgCl₂ (5 mM) DTT (1 mM) und ein Drittel der in Beispiel 1 dargestellten cDNA enthielt. Nach der Inkubation wurde der Ansatz 5 Min lang bei 70 °C gehalten, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zugabe von ATP (10 nmol) und T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim GmbH) (1 unit) gestartet.

Beispiel 3:

Amplifikation eines Aliquots der Ligationsreaktion.

Die Amplifikation fand in 100 µl eines Puffergemisches (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml Gelatine) unter Verwendung von je 40 nmol der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und je 50 pmol der beiden Primer (des für die reverse Transkription verwendeten und eines weiteren, der komplementär zum anligierten Primer war) statt. In dem Ansatz befanden sich ferner 40 % des Ligationsansatzes (Beispiel 2) und 2 units Taq Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 25 Runden durch Durchlaufen des Zyklus: 94 °C 45 Sek. 42 °C 30 Sek, 72 °C 90 Sek.

Beispiel 4:

Zweite, "Nested" Amplifikation des Amplifikationsprodukts aus Beispiel 3.

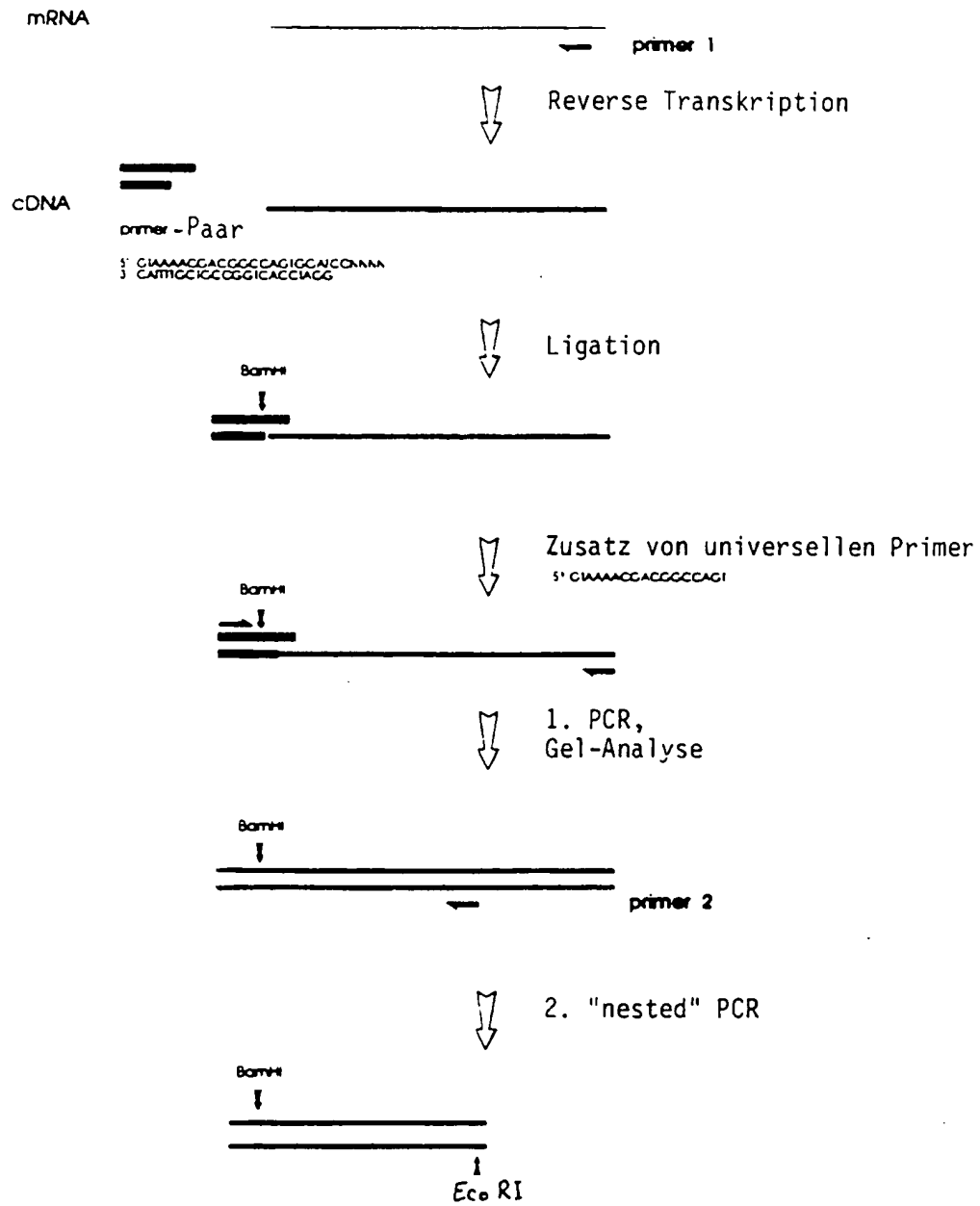
20 % des PCR-Ansatzes aus Beispiel 3 wurde auf einem 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Ausubel et al), die Bande der erwarteten Größe ausgeschnitten, und einer Aufreinigung mit Glassmilk (GeneClean, Bio 101, CA, USA) unterzogen. Die so eluierte DNA lag danach in 30 µl sterilem bidestilliertem Wasser vor. 5 µl davon wurden für eine erneute Amplifikation ausgewählt, die unter den gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 3 durchgeführt wurde, mit dem Unterschied, daß diesmal nicht der für die reverse Transkription verwendete Primer, sondern statt dessen ein ebenfalls für die getestete RNA spezifischer Primer verwendet wurde, der dem 3' Ende der ursprünglichen cDNA näher lag. Selbstverständlich erfolgte kein neuer Zusatz eines Aliquots des Ligationsansatzes. Aliquots dieses Amplifikationsansatzes wurden, wie oben beschrieben, gel-elektrophoretisch analysiert (sowohl vor, als auch nach Verdau mit passenden Restriktionsendonukleasen). Nach Aufreinigung (siehe oben) der Verdauprodukte lagen diese in einer für weitere Klonierungsschritte geeigneten Form vor.

Patentansprüche

- Verfahren zur Klonierung von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte ausführt:
 - In einem ersten Schritt, der Ligation einer doppelsträngigen Kombination von zweien, zueinander teilweise komplementären Primern, an das 3' Ende eines einzelsträngigen DNA Stranges.
 - In einer zweiten Stufe die Synthese des zweiten Stranges mittels einer DNA Polymerase, wobei ein Primer verwendet wird, der zumindest zu einem Teil des anligierten Oligonukleotids komplementär ist.
 - Gegebenenfalls in einer dritten Stufe die Amplifikation der so erhaltenen cDNA.
- Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß die einzelsträngige DNA durch reverse Transkription einer Matrizen-RNA entstanden ist.
- Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß die einzelsträngige DNA durch Bearbeitung einer Matrizen-DNA entstanden ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 und 3 unter Verwendung von modifizierten Oligos bei der Zweitstrangsynthese und in der PCR, die zum Erhalten eines Produkts führen, das resistent gegen Restriktionsendonukleasenverdau ist. 5
5. Verfahren gemäß Anspruch 4 unter Verwendung von m⁵C als modifizierte Base in einem Oligonukleotid. 10
6. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung der durch Primerextension dargestellten cDNA erfolgt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung über Affinitätschromatographie erfolgt. 15
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung durch modifizierte Primer bzw. Oligonukleotide ermöglicht wird. 20
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein biotinylierter oder digoxigenierter, markierter Primer dafür eingesetzt wird. 25
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß man Oligonukleotide, Primer verwendet, die zur Erzeugung von Restriktionsenzymserkennungsstellen im Produkt führen. 30
11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Überhang des Primerpaars mehr als drei und weniger als 6 Nukleotide umfaßt. 35
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß die Ligation durch die Gegenwart eines Enzyms ausgelöst wird, mit Spezifität für doppelsträngige DNA. 40
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, charakterisiert dadurch, daß es sich bei diesem Enzym um T4 DNA Ligase handelt. 45
14. Verfahren gemäß Anspruch 12, charakterisiert dadurch, daß es sich dabei um eine thermostabile Ligase handelt. 50
15. Verfahren gemäß Anspruch 2, charakterisiert dadurch, daß ein thermostabiles Enzym für die reverse Transkription verwendet wird. 55
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, charakterisiert dadurch, daß es sich dabei um eine DNA Polymerase mit reverser Transkriptase Aktivität handelt; z.B. Tth DNA Polymerase.
17. Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß die Gewinnung der doppelsträngigen DNA durch eine DNA abhängige DNA Polymerase geschieht.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, charakterisiert dadurch, daß es sich dabei um das Klenow Fragment der DNA Polymerase von E. coli handelt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 17, gekennzeichnet dadurch, daß es sich dabei um eine thermostabile DNA Polymerase handelt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, gekennzeichnet dadurch, daß es sich dabei um Taq Pol handelt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 17, gekennzeichnet dadurch, daß dafür modifizierte Primer verwendet werden, die eine Aufreinigung der entstehenden einzelsträngigen DNA zulassen.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei der Modifikation um Biotin und bei der Affinitätsmatrix um Avidin oder Streptavidin oder bei der Modifikation um Digoxigenin und bei der Affinitätsmatrix um Anti DIG AK handelt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß die Ligationstemperatur zwischen 15° und 25°C liegt und die Ligation für eine Dauer von 1 bis 16 Stunden durchgeführt wird.
24. Verfahren gemäß Anspruch 1, charakterisiert dadurch, daß im dritten Schritt ein weiterer, neuer Primer, komplementär zu einem Teil des an die Einzelstrang-DNA ligierten Sequenzbereichs, verwendet wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, charakterisiert dadurch, daß anschließend mehrere Amplifikationszyklen durchgeführt werden.

Figur 1





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 94 11 4675

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Y	WO-A-91 03573 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Seite 3, Zeile 23 - Seite 7, Zeile 23 * * Seite 9, Zeile 28 - Zeile 30 * * Ansprüche; Beispiel 3b * ---	1-3, 10-25	C12N15/10 C12Q1/68
D,Y	FR-A-2 678 639 (RHONE-POULENC RORER S.A.) * das ganze Dokument * ---	1-3, 10-25	
A	US-A-4 666 839 (AMGEN) 19. Mai 1987 * Spalte 3, Zeile 41 - Spalte 5, Zeile 9 * * Beispiel 7 * ---	1-25	
A	WO-A-91 18114 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 28. November 1991 * das ganze Dokument * ---	1-25	
P,X	PCR METHODS APPL. 3(2), 95-9, Oktober 1993 Bertling, Wolf M. et al 'Determination of 5' ends of specific mRNAs by DNA ligase-dependent amplification' * das ganze Dokument * -----	1-3	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C12N C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 16. Dezember 1994	
		Prüfer Andres, S	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patendokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	